

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION  
(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2001 (15.02.01)	Destinataire: Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE en sa qualité d'office élu
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Déposant PIERRARD, Jérôme etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

14 décembre 2000 (14.12.00)

dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection  a été faite n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

## TRAITE COOPERATION EN MAT DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)Date d'expédition (jour/mois/année)  
26 avril 2001 (26.04.01)Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
BET 00/0543Demande internationale no  
PCT/FR00/01725

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

JACOBSON, Claude  
Cabinet Lavoix  
2, place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09  
FRANCE

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
21 juin 2000 (21.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

 le déposant  l'inventeur  le mandataire  le représentant communNom et adresse  
RHODIA CHIMIE  
25, quai Paul Doumer  
F-92408 Coubevoie Cedex  
FRANCENationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)  
FR FR  
no de téléphone  
no de télécopieur  
no de télécopieur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

 la personne  le nom  l'adresse  la nationalité  le domicileNom et adresse  
RHODIA CHIMIE  
26, quai Alphonse-Le-Gallo  
F-92512 Boulogne Billancourt Cedex  
FRANCENationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)  
FR FR  
no de téléphone  
no de télécopieur  
no de télécopieur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

 à l'office récepteur  aux offices désignés concernés  
 à l'administration chargée de la recherche internationale  aux offices élus concernés  
 à l'administration chargée de l'examen préliminaire international  autre destinataire:Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse  
no de télécopieur (41-22) 740.14.35Fonctionnaire autorisé:  
Jocelyne Rey-Millet  
no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE VETS  
PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>BET 00/0543</b>	<b>POUR SUITE A DONNER</b>	voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après
Demande internationale n° <b>PCT/FR 00/01725</b>	Date du dépôt international ( <i>jour/mois/année</i> ) <b>21/06/2000</b>	(Date de priorité (la plus ancienne) ( <i>jour/mois/année</i> )) <b>22/06/1999</b>
Déposant <b>RHODIA CHIMIE</b>		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. **Base du rapport**

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2.  **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3.  **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

**SOUCHE AVIRULENTES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS, PRODUISANT DU XANTHANE**

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.

parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

Aucune des figures n'est à publier.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande Internationale No

PCT/FR 00/01725

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
 CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 // (C12N1/21, C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
 CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCYTIC COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abrégé ---- -/-	9-12

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
16 octobre 2000	23/10/2000
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Lejeune, R

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Ande Internationale No

PCT/FR 00/01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703 ISSN: 0894-0282 cité dans la demande abrégé page 598, colonne de droite, alinéa 5 page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p> <p>---</p>	1-8, 15
X	<p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966 ISSN: 0894-0282 cité dans la demande abrégé</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1, 2, 4-6

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 00/01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>le document en entier</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds" XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris hrpB pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds." XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p> <p>-----</p>	9-12

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGEÉE DE  
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

5

Destinataire:

JACOBSON, Claude  
Cabinet Lavoix  
2, place d'Estienne d'Orvès  
F-75441 Paris Cedex 09  
FRANCE

PTO/PCT Rec'd 21 DEC 2001

PCT

## NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

(règle 71.1 du PCT)

DT 30.03.01

Date d'expédition  
(jour/mois/année) 31.07.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
BET 00/0543

### NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.  
PCT/FR00/01725

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
21/06/2000

Date de priorité (jour/mois/année)  
22/06/1999

Déposant  
RHODIA CHIMIE et al.

99021463

- Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
- Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
- Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

#### 4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Büchler, S

Tél. +49 89 2399-8090



# TRAITE DE COOPERATION EN MATERIE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/31		
Déposant RHODIA CHIMIE et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 1 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorité</li> <li>III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Certains documents cités</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale</li> </ul>		

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 14/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 31.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Halle, F N° de téléphone +49 89 2399 8537



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)):

**Description, pages:**

1-18 version initiale

### Revendicaciones. N°:

8-19 version initiale

### Dessins, feuilles:

1/2 2/2 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-3 telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: -, qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description,      pages :
- des revendications,      n°s :
- des dessins,      feuilles :

5.  Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :  
**voir feuille séparée**

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**

**Point I.6**

1. La demande contient des feuilles de liste de séquences, feuilles numérotées de 1 à 3.

**Point V**

2. Dans ce rapport, il est fait référence aux documents suivants:

D1: J. Bac. 172, 1990, p. 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, p. 593-601 (cité dans la demande)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, p. 280-285 (cité dans la demande)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, p. 390-396 (cité dans la demande)

3. Compte tenu de l'état de la technique représenté par les documents D1-D4, l'objet des revendications 1-19 semble être nouveau et impliquer une activité inventive (Article 33(2)(3)) PCT).

En effet, comme l'a expliqué le demandeur, les souches modifiées connues (cf. D1-D4) comportent toutes des séquences d'ADN étranger au patrimoine génétique naturel de Xanthomonas campestris alors que la souche de l'invention ne contient pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel. De ce fait, il n'est pas possible de prévoir sur la seule base des données de l'état de la technique, si les souches modifiées selon l'invention sont, entre autres, non pathogènes et capables de produire des exopolysaccharides.

**Point VIII**

4. Les revendications indépendantes 11 et 12 ne semblent pas contenir toutes les caractéristiques techniques de l'invention (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). L'invention a pour objet (voir description page 4, lignes 24-26) une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène et conservé la capacité de production d'exopolysaccharide. Cependant, les souches des revendications 11 et 12 ne sont pas définies dans ce sens.
5. En vue de la définition de l'objet revendiqué (revendications 17-19), les

séquences nucléotidiques devraient être également caractérisées par leur fonction ou rôle biologique (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).

6. La définition de l'objet revendiqué selon les termes de "essentiellement non phytopathogène" (revendications 10-12) introduit une incertitude quant à la phytopathogénicité restante réelle des souches bactériennes de ces revendications (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). Par ailleurs, cette définition introduit également une ambiguïté quant au caractère non phytopathogène des souches bactériennes des revendications 10 à 12 et des souches des revendications 1 à 9 qui ne sont pas qualifiées de "essentiellement non phytopathogène".
7. Contrairement à ce qu'exige la Règle 5.1(a)(ii) PCT, la description ne cite pas le document D1 reflétant également la technique antérieure.

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT

(règle 92bis.1 et

instruction administrative 422 du PCT  
PTO/PCT Rec'd 21 JUIN 2001Date d'expédition (jour/mois/année)  
26 avril 2001 (26.04.01)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

JACOBSON, Claude  
Cabinet Lavoix  
2, place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09  
FRANCE

REÇU LE

07 MAI 2001

Cabinet LAVOIX

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
BET 00/0543

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale no  
PCT/FR00/01725Date du dépôt international (jour/mois/année)  
21 juin 2000 (21.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

 le déposant  l'inventeur  le mandataire  le représentant communNom et adresse  
RHODIA CHIMIE  
25, quai Paul Doumer  
F-92408 Coubevoie Cedex  
FRANCENationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)  
FR FR  
no de téléphone  
no de télécopieur  
no de télécopieur

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

 la personne  le nom  l'adresse  la nationalité  le domicileNom et adresse  
RHODIA CHIMIE  
26, quai Alphonse-Le-Gallo  
F-92512 Boulogne Billancourt Cedex  
FRANCENationalité (nom de l'Etat) Domicile (nom de l'Etat)  
FR FR  
no de téléphone  
no de télécopieur  
no de télécopieur

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse  
no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Jocelyne Rey-Millet

no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

1

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

OMPI REC'D 21 DEC 2000

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA  
COMMUNICATION DE LA DEMANDE  
INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Destinataire:  
JACOBSON, Claude  
Cabinet Lavoix  
2, place d'Estienne d'Orves  
F-75441 Paris Cedex 09  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 28 décembre 2000 (28.12.00)			
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543		AVIS IMPORTANT	
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)	
Déposant RHODIA CHIMIE etc		9907963	

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:  
AG,AU,BZ,DZ,KP,KR,MZ,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:  
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,  
GE,GH,GM,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,  
NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW  
La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 28 décembre 2000 (28.12.00) sous le numéro WO 00/78967

## RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la demande d'examen préliminaire international doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

## RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombelettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé J. Zahra no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

2

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

PTO/PCT Rec'd 21 DEC 2001  
**INFORMATIONS RELATIVES AUX  
OFFICES ELUS QUI ONT REÇU  
NOTIFICATION DE LEUR ELECTION**

(règle 61.3 du PCT)

Destinataire:

JACOBSON, Claude  
Cabinet Lavoix  
2, place d'Estienne d'Or  
F-75441 Paris Cedex 09  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 février 2001 (15.02.01)			
Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543		INFORMATION IMPORTANTE	
Demande internationale no PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)	
Déposant RHODIA CHIMIE etc		9307963	

1. Le déposant est informé que le Bureau international a, conformément à l'article 31.7), notifié à chacun des offices suivants son élection:

AP :GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW  
EP :AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE  
National :AU,BG,CA,CN,CZ,DE,IL,JP,KP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SE,SK,US

2. Les offices suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle ils sont notifiés de leur élection; la notification de leur élection leur sera envoyée par le Bureau international seulement à leur demande:

EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM  
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG  
National :AE,AG,AL,AM,AT,AZ,BA,BB,BR,BY,BZ,CH,CR,CU,DK,DM,DZ,EE,ES,FI,GB,  
GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MW,  
MX,MZ,PT,SD,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

3. Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices mentionnés ci-dessus avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité. Pour ce faire, il doit payer la ou les taxes nationales et remettre, si elle est prescrite, une traduction de la demande internationale (article 39.1a) ainsi que, le cas échéant, une traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3b) et règle 74.1).

Certains offices ont fixé des délais supérieurs au délai mentionné ci-dessus. Pour des renseignements détaillés au sujet des délais applicables et des actes à accomplir à l'ouverture de la phase nationale auprès d'un office donné, voir le volume II du Guide du déposant du PCT.

L'ouverture de la phase régionale européenne est différée jusqu'à l'expiration d'un délai de 31 mois à compter de la date de priorité pour la totalité des Etats désignés aux fins de l'obtention d'un brevet européen.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse  no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé:  Kiwa Mpay KMP  no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

Translation 500

10/018,786

PATENT COOPERATION TREATY

8

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

MAY 06 2002

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference SAGEM 9809216	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/FR99/01725	International filing date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)	Priority date (day/month/year) 20 July 1998 (20.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC H04L 29/06		
Applicant SAGEM S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>5</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 February 2000 (04.02.00)	Date of completion of this report 24 October 2000 (24.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR99/01725

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1, 5-13, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages 2, 2a, 3, 4, filed with the letter of 21 July 2000 (21.07.2000),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims, Nos. 2-10, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1, filed with the letter of 21 July 2000 (21.07.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01725

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I

The International Preliminary Examining Authority considers that the following amendment to method Claim 1 goes beyond the disclosure of the invention in the international application as filed (PCT Article 34(2)): "method characterized in that the **receiver is locked** by moving the position of the address field to a new position in the transmitter".

The report has therefore been established as if said amendment to Claim 1 had not been made (PCT Rule 70.2(c)).

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/01725

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Reference is made to the following documents:

D1: EP-A-0 841 813 (PHILIPS ELECTRONICS NV) 13 May 1998

D2: US-A-5 420 866 (WASILEWSKI ANTHONY J) 30 May 1995

D3: US-A-5 619 501 (CHANAY JOHN W ET AL) 8 April 1997

D4: US-A-5 651 002 (READY DAVID C ET AL) 22 July 1997

1. If Claim 1 is interpreted in light of the description and considered to be only a method for technically upgrading a receiver of data broadcast in packets, the subject matter thereof does not involve an inventive step. Indeed, document D1 describes a method for technically upgrading a data receiver (video data with their transmission and reception protocol) [...], which enables the receiver to be unlocked by loading into same a data block (new software) (column 1, lines 19-22) comprising data for programming a processor (column 3, line 18 - column 4, line 25).

The only difference between the method of Claim 1 and the method described in document D1 is the programmable combinatory logic circuits which work in conjunction with the processor in one case (Claim 1), instead of an application program memory (FLASH) which works in combination with the processor in the other case (document D1).

However, it does not appear that such a difference can be considered inventive, since it does not appear to go beyond the competence of a person skilled in the art working in the field of data transmitters and receivers.

Indeed, two devices (the flash memory and the processor) have simply been replaced with another two devices (the programmable memory circuits and the processor) in order to achieve the same result, i.e., the upgrading of a receiver.

The subject matter of Claim 1 therefore does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

2. The subject matter of Claim 5 is simply the removable storage medium for transporting the data for upgrading a receiver according to the method of Claim 1, and therefore does not involve an inventive step either (PCT Article 33(3)).
3. Dependent Claims 2-4 and 7-10 do not appear to contain additional features which, in combination with the subject matter of the claim on which they depend, could involve an inventive step (PCT Article 33(3)).  
Said additional features are either known or

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/FR 99/01725

directly derivable from the cited documents, or are alternative embodiments that have no inventive meaning of their own.

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

1. In order to meet the requirements of PCT Rule 6.3(b), the independent claims should have been **properly** presented in the two-part form, with the features found in combination in the prior art (see document D1) being indicated in the first part.
  
2. In order to meet the requirements of PCT Rule 5.1(a)(iii), the part of the description that discloses the technical problem and the solution to this problem should be revised, in view of D1 (cf. PCT Preliminary Examination Guidelines, II 4.5).

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. It is clear from the description that the following features are necessary for the definition of the invention (page 5, line 17 - page 6, line 19 and page 8, lines 25-32 for feature (a), which is considered necessary, since it is the only possibility (only example) for carrying out the invention, and page 3, lines 26-29 and page 7, lines 17-18 for feature (b)):

- (a) the step of defining a field (20) in the packet to be transmitted (P2) with a predetermined data pattern which shifts the position of the address field (12) to a new position (22),
- (b) "loading a data block" by means of a removable storage medium.

Since independent Claim 1 does not contain these features, it does not meet the requirements of PCT Article 6, in combination with PCT Rule 6.3 (b), according to which an independent claim must contain all the technical features necessary for the definition of the invention.

2.1 The subject matter of Claim 1 has not been clearly defined, contrary to the requirements of PCT Article 6, since many of the definitions in the claim are not consistent.

- (i) Are "the programmable circuits" on lines 10 and 17 the same as the "programmable combinatory logic circuits" on line 8?

## VIII. Certain observations on the international application

(ii) Is the "address field" on lines 8 and 13 the same as the "destination address field" on line 6?

(iii) Is the "loaded block" on line 23 the same as the "data block" on line 15?

2.2 The expression "by addressing" used in Claim 1 is not clear (PCT Article 6) because it is impossible to understand what is being "addressed".

3. It is clear from page 8, lines 17-32 of the description that the following features are necessary for the definition of the invention as claimed in Claim 6:

- (a) a transmitter that transmitts data in packets with the position of the destination address field (12) being moved;
- (b) the address field (12) being moved to a new position (22) by a field having a predetermined data pattern (20).

Since independent Claim 6 does not contain these features, it does not meet the requirements of PCT Article 6, in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which an independent claim must contain all the technical features necessary for the definition of the invention.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/01725

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //C12N1/21, C12R1:64)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**SEARCH RECD 21 DEC 2001**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abstract	9-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2000

Date of mailing of the international search report

23/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR/01725

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract page 598, right-hand column, paragraph 5 page 599, right-hand column, last paragraph</p> <p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966 ISSN: 0894-0282 cited in the application abstract</p>	1-8, 15 1, 2, 4-6
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern	1st Application No
PCT	00/01725

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, October 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cited in the application</p>	17-19
Y	<p>the whole document</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC M99176, 10 September 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris <i>HrpC2</i> gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>87.2% identity (1188 base pairs) with SEQ ID NO 3</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online!</p> <p>AC U33548, 10 November 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris <i>hrpB</i> pathogenicity locus proteins <i>HrpB1</i>, <i>HrpB2</i>, <i>HrpB3</i>, <i>HrpB4</i>, <i>HrpB5</i>, <i>HrpB6</i>, <i>HrpB7</i>, <i>HrpB8</i>, <i>HrpA1</i>, and <i>ORF62</i> genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>78.8% identity (1043 base pairs) with SEQ ID NO 6</p> <p>80.2% identity (702 base pairs) with SEQ ID NO 7</p>	9-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No  
PCT/00/01725

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 // (C12N1/21, C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCYTIC COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abrégé -/-	9-12

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR/01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601, XP000908703</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p> <p>page 598, colonne de droite, alinéa 5 page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p> <p>—</p>	1-8, 15
X	<p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285, XP000901966</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande abrégé</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1, 2, 4-6

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar	Internationale No
PCT/FR	01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-395, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>le document en entier</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris <i>hrpB</i> pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p> <p>-----</p>	9-12

## TRAITEMENT COOPERATION EN MATERIE DE BREVETS

PCT

03/06/2001

## RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0543	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01725	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/31		
Déposant RHODIA CHIMIE et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 1 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I  Base du rapport
- II  Priorité
- III  Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV  Absence d'unité de l'invention
- V  Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI  Certains documents cités
- VII  Irrégularités dans la demande internationale
- VIII  Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 14/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 31.07.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international: Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Halle, F N° de téléphone +49 89 2399 8537



# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les éléments de la demande internationale (les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)):

**Description, pages:**

1-18 version initiale

## Revendications. N°:

8-19 version initiale

1-7 recue(s) le 10/07/2001 avec la lettre du 10/07/2001

## Dessins, feuilles:

1/2.2/2 version initiale

## Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-3, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: qui est :

- la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01725

- La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listages des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- de la description,      pages :
- des revendications,   n°s :
- des dessins,      feuilles :

5.  Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :  
**voir feuille séparée**

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-19
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :  
**voir feuille séparée**

**Point I.6**

1. La demande contient des feuilles de liste de séquences, feuilles numérotées de 1 à 3.

**Point V**

2. Dans ce rapport, il est fait référence aux documents suivants:

D1: J. Bac. 172, 1990, p. 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, p. 593-601 (cité dans la demande)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, p. 280-285 (cité dans la demande)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, p. 390-396 (cité dans la demande)

3. Compte tenu de l'état de la technique représenté par les documents D1-D4, l'objet des revendications 1-19 semble être nouveau et impliquer une activité inventive (Article 33(2)(3) PCT).

En effet, comme l'a expliqué le demandeur, les souches modifiées connues (cf. D1-D4) comportent toutes des séquences d'ADN étranger au patrimoine génétique naturel de Xanthomonas campestris alors que la souche de l'invention ne contient pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel. De ce fait, il n'est pas possible de prévoir sur la seule base des données de l'état de la technique, si les souches modifiées selon l'invention sont, entre autres, non pathogènes et capables de produire des exopolysaccharides.

**Point VIII**

4. Les revendications indépendantes 11 et 12 ne semblent pas contenir toutes les caractéristiques techniques de l'invention (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). L'invention a pour objet (voir description page 4, lignes 24-26) une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène et conservé la capacité de production d'exopolysaccharide. Cependant, les souches des revendications 11 et 12 ne sont pas définies dans ce sens.
5. En vue de la définition de l'objet revendiqué (revendications 17-19), les

séquences nucléotidiques devraient être également caractérisées par leur fonction ou rôle biologique (Article 6, Règle 6.3(a) PCT).

6. La définition de l'objet revendiqué selon les termes de "essentiellement non phytopathogène" (revendications 10-12) introduit une incertitude quant à la phytopathogénicité restante réelle des souches bactériennes de ces revendications (Article 6, Règle 6.3(a) PCT). Par ailleurs, cette définition introduit également une ambiguïté quant au caractère non phytopathogène des souches bactériennes des revendications 10 à 12 et des souches des revendications 1 à 9 qui ne sont pas qualifiées de "essentiellement non phytopathogène".
7. Contrairement à ce qu'exige la Règle 5.1(a)(ii) PCT, la description ne cite pas le document D1 reflétant également la technique antérieure.

modif

BFF

REVENDICATIONS

- 5 1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide et ne contenant pas d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel.
- 10 2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.
- 15 3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.
- 20 4. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.
- 25 5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.
6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris* *pv campestris*.
- 30 7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou desdit(s) gène(s) est obtenue par déletion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/01/8786  
soc

T6

Applicant's or agent's file reference BET 00/0543	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01725	International filing date (day/month/year) 21 June 2000 (21.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/31		
Applicant RHODIA CHIMIE		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14 December 2000 (14.12.00)	Date of completion of this report 31 July 2001 (31.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR00/01725

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description. pages 1-18, as originally filed.

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand.

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims. Nos. 8-19, as originally filed.

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19.

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand.

Nos. 1-7, filed with the letter of 10 July 2001 (10.07.2001)

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings. sheets/fig 1/2.2/2, as originally filed.

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand.

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description. pages \_\_\_\_\_

the claims. Nos. \_\_\_\_\_

the drawings. sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/FR 00/01725

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*).

1. The application includes sheets containing lists of sequences; these sheets are numbered from 1 to 3.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/FR 00/01725

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

2. The following documents are referred to in this report:

D1: J. Bac. 172, 1990, pages 5165-5172

D2: Mol. Plant-Microbe Interactions 4, 1991, pages 593-601 (cited in the application)

D3: Mol. Plant-Microbe Interactions 3, 1990, pages 280-285 (cited in the application)

D4: Mol. Plant-Microbe Interactions 5, 1992, pages 390-396 (cited in the application).

3. In relation to the prior art disclosed in documents D1-D4, the subject matter of Claims 1-19 appears to be novel and to involve an inventive step (PCT Article 33(2) and (3)).

Indeed, as explained by the applicant, the known modified strains (see D1-D4) all contain DNA sequences which do not belong to the natural genetic base of Xanthomonas campestris, whereas the strain of the present invention contains no DNA alien to its natural genetic base. Consequently, it is impossible to predict, solely on the basis of the prior art data, whether the modified strains of the invention are, *inter alia*, non-pathogenic and capable of producing exopolysaccharides.

**VIII Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

3. Independent Claims 11 and 12 do not appear to contain all the characterising technical features of the invention (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)).  
The invention concerns (see description on page 4, lines 24-26) a bacterial strain which has lost its phytopathogenic activity and retained its ability to produce exopolysaccharides. However, the strains of Claims 11 and 12 are not defined in that way.
5. In view of the definition of the claimed subject matter (Claims 17-19), the nucleotide sequences ought likewise to be characterised by their biological function or role (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)).
6. The definition of the claimed subject matter as being "essentially non phytopathogenic" (Claims 10-12) introduces doubt as to the actual remaining phytopathogenicity of the bacterial strains of these claims (PCT Article 6 and Rule 6.3(a)). In addition, this definition creates ambiguity as to the non-phytopathogenic nature of the bacterial strains of Claims 10-12 and of the strains of Claims 1-9, which are not referred to as being "essentially non-phytopathogenic".
7. Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not mention D1, which also reflects the prior art.

Rec'd on 21 Dec 01  
PCT 34 ANDT

CLAIMS

1. A bacterial strain which has lost the phytopathogenic nature by inactivation of at least one 5 virulence gene, and which has conserved the ability to produce exopolysaccharide.

2. The bacterial strain as claimed in claim 1, characterized in that it has been made stably nonphytopathogenic by inactivation of at least one 10 gene, advantageously at least two genes, preferably at least three genes, of the *hrp* or *hrc* gene group.

3. The bacterial strain as claimed in claim 1 or claim 2, characterized in that it has been made stably nonphytopathogenic by inactivation of 5 to 9 15 genes of the *hrp* or *hrc* gene group.

4. The bacterial strain as claimed in claim 1, characterized in that it is a *Xanthomonas* strain which has lost the phytopathogenic nature by inactivation of at least one virulence gene, and which 20 has conserved the ability to produce exopolysaccharide.

5. The *Xanthomonas* strain as claimed in claim 4, characterized in that it is of the species *Xanthomonas campestris*.

6. The *Xanthomonas* strain as claimed in 25 claim 5, characterized in that it is *Xanthomonas campestris* *pv campestris*.

7. The *Xanthomonas* strain as claimed in any

one of the preceding claims, characterized in that the inactivation of said gene(s) is obtained by deletion of a region of DNA of at least 1 kb, preferably at least 3 kb, advantageously at least 5 kb, in the *hrp* or *hrc* gene group, and in that it conserves the ability to produce exopolysaccharide.

8. The *Xanthomonas* strain as claimed in any one of the preceding claims, characterized in that it comprises a deletion of a region of DNA of at most 10 40 kb.

9. The *Xanthomonas* strain as claimed in claim 8, characterized in that it is obtained by deletion of all or part of the *hrp A1* to *hrpC2* genes.

10. An essentially nonphytopathogenic 15 *Xanthomonas* strain, characterized in that it comprises a deletion of a region of DNA of at least 1 kb, preferably at least 3 kb, advantageously at least 5 kb, in the *hrp* or *hrc* gene group, and in that it conserves the ability to produce exopolysaccharide.

20 11. An essentially nonphytopathogenic *Xanthomonas* strain, characterized in that it is obtained by deletion of all or part of the *hrp A1-C2* genes.

12. An essentially nonphytopathogenic 25 *Xanthomonas campestris* strain, chosen from the BIOCAT 1016, BIOCAT 1017, BIOCAT 1019, BIOCAT 1021 and

BIOCAT 1022 strains, deposited at the CBS under the numbers CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 and CBS 101944, respectively.

13. The *Xanthomonas* strain as claimed in one of claims 4 to 13, characterized in that the exopolysaccharide is a xanthan gum.

14. A pRPA-BCAT 140 plasmid, used for manufacturing the strain as claimed in claims 9 to 13.

15. A method for preparing a strain as claimed in any one of claims 7 to 13, characterized in that the strain is obtained by homologous recombination with a plasmid comprising a deletion of all or part of the *hrp* or *hrc* genes.

16. A method for preparing bacterial exopolysaccharide, in particular xanthan gum, characterized in that a bacterial strain, where appropriate of the *Xanthomonas* genus, preferably of the species *Xanthomonas campestris* as claimed in any one of claims 1 to 13, is cultured under conditions which allow the production of exopolysaccharide in the fermentation medium.

17. A nucleic acid, characterized in that it comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 3.

18. A nucleic acid, characterized in that it comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 6.

19. A nucleic acid, characterized in that it

comprises the nucleotide sequence SEQ ID No. 7.

10/018786  
Rec'd PCT/PTC 21 DEC 2001  
PCT/FR00/01725

WO 00/78967

1

SEQUENCE LISTING

<110> RHODIA CHIMIE

<120> Novel bacterial strains, especially strains of Xanthomonas,  
in particular Xanthomonas campestris

<130> BFF 99/0315

<140> FR 9907963

<141> 1999-06-22

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primer

<400> 1

aaattcgtca agggtgatgc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primer

<400> 2

gttccacactg gtcgacaaggc

20

<210> 3

<211> 1189

<212> DNA

<213> Xanthomonas campestris

<400> 3

aaatcgatca aagggtgatgc gategcgggc ctgggtgatca ccatggtcaa catcttggcc 60  
ggcattcgatgg taggcgtgac ctaccacggc atgagcgcgg gcgaggccgc caaccgttt 120  
gcgtatcctgt cggtagggcga tgcgatgggt tcgcagatcg cctcgctgt gatctcggtg 180  
gcggccggcg tcatgatcac cgcgcgtcgcc aacgagaatg aaaccaagat cagctcgctc 240  
gggctcgaca tcggccgcca gtcaccaggc aacgcacgtg ccttgcgttgc agcgagtgtg 300  
ctgctggcct gctttcggtt cgtgcggggta tttccggcgc tgcgtttctt gctgcgtggca 360  
gcggcggtcg gtgcgggggg ctatacgatc tggcgcaaggc aacgcgacac cagcgggagc 420  
gatcagcccg cactgccatc aaccagccgc aaaggcgcca aaggcgatgc gcccgcacatc 480  
cgcaagagcg ccccgaggattt cgcctcgccc ttgtcgatgc ggctttcgcc gcaactggct 540  
gcacggctcg acccggcgatc gctggatcag gcgatcgaaa gcgagcggag gcaattggcc 600  
gagctgctgg gattggcggtt cccggggatc gcgatatggc agagcgaatc cctgcagggc 660  
ctgcagttacg aagtgttgc acacgatgtg ccggaaaccc gcagcgcgtt gagcgatacg 720  
gcggacatgc agaaagcgatc gccccaaacaa gccatcgac cgttgcgttgc acgcgcgcat 780

ctgttcgtcg gcatccagga gacgcagtgg atgctggaac aggtggggcg ggactatccc 840  
gggctgggtt cagaggtaa caaggccatg ccagcccaac gcatcgccga tgggttgcgg 900  
cgactgctgg aagaacgcac cccgggtcgcc aacatcaaga gcatcctggaa gagcctgggtg 960  
gtgtggggac cgaaggaaaa ggatctgtg atgctgaccg agtatgtgcg ctgcgatctc 1020  
ggccgcatac ttgcgcacac cgcgcggca ggcacccggac agtcgcctgc ggtgatgctc 1080  
gaccacgcgg tgaaacgtt gatccggcag tcgattcgcc ccacacccggc cggcaatttc 1140  
ctggcgctgc caccggagca ggccaatcag cttgtcgacc aggtggaaa 1189

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificial sequence description: primer

<400> 4  
gatccaacag ctggacaacc

20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Artificial sequence description: primer

<400> 5  
aacggaatct tcgacaggcc

20

<210> 6  
<211> 1818  
<212> DNA  
<213> Xanthomonas campestris

<400> 6

atggcatacg cctgtccctcc agttcaccgc catcgacgcg cgccgttggc cgctgccttg 60  
 ttgcttggct tgctgcgcgct gctgcccggc catgccaacg ccgcgtcggt gcccgtggcac 120  
 tcgcgcagct tcaaataacgt tgccgaccgc aaggatctca aggaggtgt ggcgcacctg 180  
 tccgcgcaggcc aatccatcac caccctggatt tcaccggagg tgaccggcac getcagtggc 240  
 aaattcgaag ccactccgca gaagtttctc gacgatctat cggggcagctt cggttttgtc 300  
 tggtattacg atggctcggt gctcagaatac tggggcgcga acggacccaa gaatgcgacc 360  
 tttagtggctt ggcgtgcata gacgatgtcgct cgctgcgtat cgcttgcgcg catgcggctg 420  
 gacgatccgc gttttccggc cgggttatgac gagacagcgc accttggcggt ggtgtccggc 480  
 ccggccgggtt atgtggatac cgtcgccggc atgcgcacgc aggtcgagca ggtcgcgcgc 540  
 caacgcgaacg ccacccgaatg gcagggtgtt cagctgcatt atgcgcaggc ggccgaccac 600  
 accacccgca tgggtggctca agacatccag gtgcgggca tggccagcct gttgcgcac 660  
 atatacggcg tgcgtggcgc gcccactgcg ggcgtgcctt ggcaggcgc gaatttccgg 720  
 cgtgtgcaac cgtatccggcgg tggctcgatcc aataccctcg gcaacagegg tcagegcac 780  
 agtggccggc gcggcattct cgggttgcgtt ggcgtgtgtt tggcgctgg gtcgcgttcc 840  
 gageggggc cggtcactcc gccgttgcgcg ggcagtggca atagcgcacaa tgcgcggc 900  
 agcgtgtggc cggagatgag ccaggccaga cgcgtgcgc cgcgtgcgtt gacgcggc 960  
 agcggccgggt agctggcata cgcgcgcgcg gtgatcgaa cgcacccggc cacaacacggc 1020  
 attcatttc cgcacccggcc cgcaggatg ggcgcctatg gcacgttgat ccagcagctc 1080  
 gacaacccgc ccaagctgct gcagatcgat gcaacccatca tggatccg cgacggcgc 1140  
 ctcgcaggatc tggcgctgga ctggcggttc cacagccggc gtgcggatgt gcagacccggc 1200  
  
 gacggccgcgtg gtggccagct tggctacgtt ggcagcttga ggcgtgcage agccgcgg 1260  
 gcacccgcgc cggttgggggg gacgttgacc gctgtccctgg ggcgtgcagg ggcgttaccc 1320  
 atgcacgcgcg tctcgccgcgt cgagcagacc aacaaggcca agatcgatcc caccggc 1380  
 gtggcgacgc tggacaaacgt ggaaggcggtt atggaccaca agcaacacgc attcgatcg 1440  
 gtcagcggtt atgcacccgcgc cgcacccatcc aacatgtccg cgggtgtatc gtcacgcgt 1500  
 ttggccaaatg tggcgccggg gtcgccttgcgat ggcacccatcc ggcgttgcgtt ggcgtatcgaa 1560  
 gacggccgtt tggcgccaa taccgtcgat ggcacccatcc tcatcaccc cagcgagatc 1620  
 accacgcagg ctttcgtcaa cgaggccgcg agcctgttga tggccggta tgcgtccgc 1680  
 accgatcaga cagatctgaa caacgtcccc gggctgttca ggatccatt gtcggcaac 1740  
 ctgttcaaggc atgcgcagca gacggggcgcg ggcgttgcgtt gtcacccatcc gtcacccatcc 1800  
 catatcgatc cgccttgc 1818

<210> 7  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Xanthomonas campestris

<400> 7  
 atgcgtcttt ggctgagggtc cacacccggaa gcggtccggcc ttgactgcgaa ggtcatccca 60  
 cgcgaggcat tggctgtgt gctggactt gacgcagcg gtcgcacagg gacgcgcgt 120  
 tgcgcgcagg cgctggcgga cgcggccgcg cgtgcgcagg cgctgcgtcgat cgctgcctt 180  
 cggcaggccg aggccatcc tcaaggatgcc cacgacaggc cgcgcgcgcg tgcacgcgt 240  
 ggctatggccg cgggctgcgtt cgcgtcgatcc gacgcgttgcgaa acgagcgcgg cgtgcggcat 300  
 gccttcgcgg cccaggacgcg cgcacggccgc gcccgcgcgc gcttggccga gatcgatcg 360  
 cacgcgtcgat agcagggttcc gacccggcgc gatcgatcgatcc cgcgtgcgtt ggcgcgcgc 420  
 caggcgctgg acggccccc ggcacggccgcg aacgccttgcg aggtgagcgtt gtcacccatcc 480  
 ggcgtggacgt atgcacggcg cgccttcgtat ggcgcgcgcg cggccggccgg atggagcatg 540  
 cccggcgatc tgcgtccgc taccgttgcgtt ggccttgggtt cctgcgtgtt gcaatggat 600  
 accggcgatc tgcgtccgc taccgttgcgtt ggccttgggtt cctgcgtgtt gcaatggat 660  
 cgcgtgttgcgatcc cgccttcgtat ggcgcgcgcg gatcgatcgatcc 702

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 00/78967 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12N 15/31, C12P 19/06, C07K 14/21, C12N 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:64)

(74) Mandataire: JACOBSON, Claude; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:  
PCT/FR00/01725

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 21 juin 2000 (21.06.2000)

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt: français

Publiée:

(26) Langue de publication: français

— Avec rapport de recherche internationale.  
— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(30) Données relatives à la priorité:  
99/07963 22 juin 1999 (22.06.1999) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): RHODIA CHIMIE [FR/FR]; 25, quai Paul Doumer, F-92408 Coubevoie Cedex (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): PIERRARD, Jérôme [FR/FR]; 3, rue Hector-Berlioz, F-69009 Lyon (FR). SIMON, Jean-Luc [FR/FR]; 4, route de Limoges, F-79500 Melle (FR). CHEVALLEREAU, Paule [FR/FR]; Rue Eloi Ricard, F-79500 Melle (FR).

WO 00/78967 A1

(54) Title: AVIRULENT XANTHOMONAS-CAMPESTRIS STRAINS PRODUCING XANTHAN

(54) Titre: SOUCHES AVIRULENTES DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS, PRODUISANT DU XANTHANE

(57) Abstract: The invention concerns a bacterial strain which has lost its phytopathogenic character by inactivation of at least one virulence gene and preserved its capacity for producing exopolysaccharide.

(57) Abrégé: Cette invention concerne une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

SOUCHE AVIRULENTES DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS*, PRODUISANT DU XANTHANE

L'invention a pour objet de nouvelles souches bactériennes, notamment de *Xanthomonas*, en particulier *Xanthomonas campestris* ayant perdu le caractère phytopathogène mais ayant sensiblement conservé la capacité de production d'exopolysaccharide, notamment de gomme xanthane.

5 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* est une bactérie Gram-négative phytopathogène des Crucifères utilisée pour la production industrielle de gomme xanthane (Martin, 1994, Res. Microbiol. 145 :9 93-97).

10 L'importance économique de cet exopolysaccharide a suscité de nombreuses études sur les gènes impliqués dans cette synthèse (Martin, 1994, précité).

15 De nombreux déterminants de la pathogénicité ont été décrits (Dow et Daniels, 1994, In *Bacterial pathogenesis of plants and animals*, JL Dangl, ed. Springer Verlag, Heidelberg). Parmi eux, se trouvent des enzymes extracellulaires à activité hydrolytique sur les tissus végétaux. Lorsque le système de sécrétion responsable de l'export de ces enzymes est inactivé, les souches de *X. campestris* ont un phénotype non phytopathogène associé à des symptômes des plantes très réduits (Dow et Daniels, 1994, précité). Parmi les déterminants de la pathogénicité décrits se trouve l'exopolysaccharide, qui semble avoir un rôle dans la phase précoce de la maladie (Dow et Daniels, 20 1994, précité ; Katzen et al., 1998, J. Bacteriol. 180 : 1607-1617). De même, un gène *hrpXc*, décrit chez *X. campestris* pv. *campestris* (Kamoun et al., 1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5 : 22-33), est impliqué dans la suppression des réponses de défense de la plante hôte compatible, puisque sa mutation entraîne une réaction nécrotique caractéristique (réponse d'hypersensibilité, HR). Les gènes d'avirulence décrits chez les différents pathovars de *X. campestris* sont aussi impliqués dans la pathogénicité de la bactérie puisqu'ils sont reconnus par la plante possédant le gène de résistance correspondant et conduisent à une réaction HR (Dow et Daniels, 1994, précité ; Yang et al., 25 1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 : 627-631). Parmi les autres gènes impliqués dans la pathogénicité des *Xanthomonas* (Dow et Daniels, 1994, précité), ont été décrits deux gènes chez *X. campestris* pv *campestris* dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite sans modifications des 30 niveaux d'accumulation d'enzymes extracellulaires et d'exopolysaccharides

(Osbourne *et al.*, 1990, Mol. Plant Microbe Interact. 3 : 280-285). D'autres déterminants de la pathogénicité sont constitués par différents jeux indépendants de gènes régulateurs de la synthèse des enzymes extracellulaires et de l'exopolysaccharide parmi lesquels on trouve : les gènes 5 *rpfA* à *H*, dont des mutations conduisent à une réduction de la production d'exopolysaccharide ; *rpfN*, un represseur de la synthèse de ces enzymes et de l'exopolysaccharide ; *clp*, dont des mutations conduisent à une pathogénicité réduite et à une moindre production d'exopolysaccharides (Dow et Daniels, 1994, précité). Enfin, d'autres déterminants de la pathogénicité 10 sont constitué par les gènes *hrp*.

Les gène *hrp* (réaction d'hypersensibilité et pathogénicité) sont essentiels pour la pathogénicité sur plante compatible et pour la réaction d'hypersensibilité sur les hôtes résistants (Alfano et Collmer, 1997, J. Bacteriol. 179 : 5655-5662). Ils ont été clonés et caractérisés à des degrés divers chez 15 plusieurs bactéries phytopathogènes des genres *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas* où ils sont relativement conservés (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Alfano et Collmer, précité), en particulier chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Huguet *et al.*, 1998, Molec. Microbiol 29 : 1379-1390 ; Fenselau *et al.*, 1992, Molecular 20 Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396 ; Bonas, 1994, précité). Les plus conservés d'entre eux ont d'ailleurs été renommés gènes *hrc* (Bogdanove *et al.*, 1996, Mol. Microbiol., 20 : 681-683). Parmi les fonctions des gènes *hrp* décrites à ce jour se trouvent la régulation de leur expression, la production de 25 protéines élicitrices de la réponse de l'hôte, la constitution d'un système de sécrétion spécifique (dit de type III) et la synthèse de glucanes periplasmiques (Zurek et Bukowski, 1998, Acta Microbiologica Polonica, 47 : 227-241 ; Mudgett et Staskawicz, 1998, Current Opinion in Microbiology 1 : 109-114 ; Lindgren, 1997, Annu Rev. Phytopathol. 35 :129-152 ; Alfano et Collmer, 1997, précité ; Bonas, 1994, précité). Un ensemble de gènes *hrp* a été cloné chez *X. campestris* pv. *campestris* (Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4 : 593-601) mais non séquencé. Il est aussi rapporté que les souches porteuses 30 de mutations dans ces gènes réalisées à l'aide d'un transposon auraient une production normale d'exopolysaccharide d'après l'aspect des colonies sur

boite. Aucune quantification plus précise de la productivité de xanthane de ces souches n'a toutefois été publiée.

En outre, les mutations réalisées chez ces souches ne possèdent pas un caractère de stabilité suffisant pour une utilisation industrielle pour la production de gomme xanthane. En effet, le transposon utilisé contient le gène codant pour la transposase (Simon *et al.*, 1989, *Gene* 80 : 161-169) ce qui n'exclue pas un événement d'excision du transposon à une fréquence pouvant être estimée entre  $10^{-6}$  et  $10^{-3}$  par génération (Berg *et al.*, 1989, In Berg and Howe ed., *Mobile DNA*, American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 879-926 ; Craig, In *Escherichia coli and Salmonella*, Neidhardt *ed.*, ASM Press, Washington, D.C. pp 2339-2362). De plus, le transposon utilisé contient un gène de résistance aux antibiotiques néomycine et kanamycine. Enfin, le transposon inséré dans le génome de ces souches constitue un élément d'ADN non homologue puisque celui-ci n'est pas un élément naturel du génome de la souche utilisée.

Bien qu'il n'existe pas de réglementation spécifique à l'heure actuelle en Europe imposée par le caractère phytopathogène de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, il est hautement souhaitable, pour des raisons liées à l'environnement, d'utiliser des souches de *Xanthomonas campestris* non phytopathogènes, afin de diminuer le risque éventuel de contamination de cultures d'intérêt agronomique à proximité du site. La sélection d'une telle souche par les techniques classiques de mutagenèse aléatoire de production est un processus long et fastidieux puisqu'il doit faire intervenir un criblage à haute capacité permettant d'isoler une souche non phytopathogène mais ayant conservé ses caractéristiques de productivité, c'est-à-dire sans mutations secondaires.

Par ailleurs, l'utilisation d'une souche génétiquement modifiée produisant une gomme xanthane modifiée (telle que décrite dans US 5,514,791) ou ayant une productivité améliorée est soumise à une réglementation stricte (Theilleux 1998, Dictionnaire permanent Bioéthique et Biotechnologies, ed Législatives, pp 1595-1648). Celle-ci impose notamment pour une construction réalisée dans une souche présentant un danger pour les plantes, d'adopter des mesures de confinement sévères sur le site de

production. Les investissements nécessaires auraient alors des conséquences économiques négatives.

Il existe par conséquent un besoin de disposer d'une souche industrielle de *X. campestris* stablement dépourvue de caractère phytopathogène mais ayant retenu ses propriétés de productivité de gomme xanthane. De plus, pour des raisons réglementaires et afin de simplifier le traitement des déchets issus de la séparation de la gomme xanthane de la biomasse, il est utile que la souche ne contienne pas de gène hétérologue codant pour une résistance à un antibiotique. Enfin, au regard des législations française et européenne, il est préférable que la souche obtenue ait été construite par autoclonage, ce qui signifie qu'elle ne contienne pas d'éléments d'ADN étranger à son patrimoine génétique naturel.

Les travaux des inventeurs ont permis la construction d'une souche de *X. campestris* possédant les propriétés requises.

De manière surprenante, il a été montré grâce à l'invention qu'une bactérie devenue non phytopathogène de manière stable, par délétion d'un fragment de taille importante affectant plusieurs kilobases de gènes impliqués dans la virulence, était néanmoins capable de produire de la gomme xanthane.

De manière plus surprenante encore, la souche modifiée de l'invention produit de la gomme xanthane en une quantité et une qualité en tous points comparables à celle produite par la souche sauvage à partir de laquelle la construction a été réalisée.

L'invention a pour objet une souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

La souche bactérienne selon l'invention est avantageusement rendue stablement non phytopathogène par délétion d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et de préférence 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Par "stablement dépourvue de caractère phytopathogène", on entend que ce caractère est conservé après un nombre de cycles cellulaires

d'au moins 20 générations, avantageusement d'au moins 30 générations, de préférence d'au moins 40 générations.

5 Parmi les bactéries ayant perdu leur caractère phytopathogène et utilisables pour une production industrielle d'exopolysaccharide, on peut citer en particulier les genres suivants : *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Xanthomonas*.

10 L'invention a notamment pour objet une souche *Xanthomonas* essentiellement dépourvue de caractère phytopathogène de manière stable et ayant conservé sensiblement la capacité de production d'exopolysaccharide.

15 Par "essentiellement non phytopathogène", on entend l'absence de lésions et/ou flétrissures envahissantes sur des feuilles de plantes hôtes crucifères, notamment le chou (*Brassica oleracea*), après au moins 15 jours suivant l'inoculation de la feuille par blessure de la nervure centrale.

20 Avantageusement, la souche *Xanthomonas* est de l'espèce *campestris*, en particulier *pv campestris*.

25 L'inactivation du(des)dit(s) gène(s) est obtenue de préférence par une délétion d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, de préférence 9 kb et pouvant aller jusqu'à 40 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

Dans un mode de réalisation préféré, la souche de *Xanthomonas*, notamment *campestris* essentiellement non phytopathogène selon l'invention est obtenue par délétion des gènes *hrpA1* à *hrpC2* d'une souche sauvage phytopathogène de *Xanthomonas campestris* *pv campestris*.

30 La gomme xanthane produit par les souches de *Xanthomonas* de l'invention est une gomme xanthane sensiblement identique à celle produite par l'espèce sauvage, à savoir qu'elle présente sensiblement la même distribution de poids moléculaire, ainsi que le même degré de modifications, notamment des degrés d'acétylation et de pyruvylation.

35 L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'une souche telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'elle est obtenue

par recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

5 L'invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence de l'espèce *Xanthomonas campestris* telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

10

15 Les exemples qui suivent illustrent la construction de souches de *Xanthomonas campestris* répondant aux caractéristiques de l'invention.

20 Dans ces exemples, la construction a été réalisée à partir d'une souche de *Xanthomonas campestris* *pv campestris* obtenue par criblage de gomme xanthane.

25 Il va de soi qu' d'autres souches de *Xanthomonas* et également de bactéries productrices d'exopolysaccharide appartenant à un genre différent accessibles à l'homme du métier peuvent être utilisées comme matière première de départ pour réaliser des souches non phytopathogènes, conformément aux connaissances générales du domaine technique en question et aux indications données ci-après, notamment en se référant aux parties de séquences rapportées dans le cas où la souche appartient à l'espèce *Xanthomonas campestris*.

Pour leur compréhension, on se reportera aux figures annexées sur lesquelles :

30 - la figure 1 schématise la stratégie de construction de dérivés de la souche de *X. campestris* RPA-BIOCAT826 porteurs d'une délétion de gènes *hrp*.

L'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris* *pv vesicatoria* est décrite par Fenselau et Bonas (1995, Mol. Plant Microbe Interact. 8 (6),

845-854 ) et par Fenselau *et al.*, (1992, Mol. Plant Microbe Interact. 5, 390-396) et est disponible en partie dans Genebank sous le numéro d'accès U 33548. Les régions homologues clonées à partir de la souche RPA-BIOCAT826 sont représentées ainsi que le nom des plasmides dans lesquels elles ont été clonées. La carte de restriction de la région *hrp* de *X. campestris* pv *campestris* est publiée par Arlat *et al.*, 1991, Mol. Plant Microbe Interact 4:593-601, et est complétée par les résultats présentés dans les exemples 1 à 4. La délétion  $\Delta hrpA1-C2$  portée par le plasmide pRPA-BCAT140 décrit dans les exemples a été introduite dans le génome par double recombinaison homologue ;

10 - la figure 2 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPB5 décrite ci-dessous et les ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 et de deux dérivés de cette souche ayant intégré la délétion  $\Delta hrpA1-C2$ . La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

15 - la figure 3 représente les signaux d'hybridation obtenus en Southern Blot avec la sonde HRPC2 décrite ci-dessous et les ADN génomiques de la souche RPA-BIOCAT826 et de 5 dérivés de cette souche ayant intégré la délétion  $\Delta hrpA1-C2$ . La position des bandes du marqueur de taille a été rapportée par comparaison avec la distance de migration sur le gel coloré au bromure d'éthidium avant transfert. Ces tailles sont exprimées en kilobases.

25

### Matériels et méthodes

Sauf autres précisions, les techniques mises en oeuvre sont des techniques classiques de biologie moléculaire et de microbiologie, connues de l'homme de l'art telles que décrites par exemple par Ausubel *et al.*, 1987 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York ; Maniatis *et al.*, 1982, Molecular Cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York), Coligan *et al.*, 1997 (Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, Inc)..

### 1. Souche de départ

La souche RPA-BIOCAT826 est issue de la collection de Rhodia Chimie (Usine de Melle, RTAM) et a été sélectionnée pour son aspect morphologique blanc au lieu de l'habituel aspect jaune. Les souches RPA-BIOCAT1016, 1017, 1019 et 1021 ont été déposées à la CBS sous les numéros respectifs CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

### 2. Milieu de culture MSX

10

Le milieu MSX employé pour la culture des *Xanthomonas* contient : 0,2 g/l d'extrait de levure; 1,2 g/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 7,3 g/l de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,25 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g/l de glucose et 15 g/l de Bacto-Agar pour le milieu gélosé ; 10 g/l de glucose pour le milieu liquide. Le sulfate de magnésium et le glucose sont stérilisés à part et ajoutés extemporanément. Le pH du milieu est équilibré à pH 7,2 avant stérilisation avec de l'acide sulfurique dilué à 10 %.

20

25

25

30

Les préparation d'ADN génomique ont été réalisées à partir de jeunes cultures liquides en MSX (OD660 inférieure à 0,4). Après centrifugation de 40 ml de culture, le culot cellulaire est repris dans 11,9 ml de tampon TE (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York) et 630  $\mu\text{l}$  de SDS 10 % (Sodium Dodecyl Sulfate) puis 63  $\mu\text{l}$  de Protéinase K à 20 mg/ml sont ajoutés. Après incubation de 1 h à 37°C, 2,1 ml de NaCl 5M sont ajoutés, suivis par 1,7 ml de 10% CTAB dans une solution de NaCl 0,7M et le tout est incubé 10 min à 65°C. Après une première extraction avec un volume équivalent d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) suivie d'une deuxième extraction par un volume équivalent d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1), le surnageant est ajouté à 0,6 volume d'isopropanol. Après centrifugation (5 min à 10 000 tours/min), le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol à 70% puis séché avant d'être repris dans au moins 2 ml de TE auxquels est ajouté 25  $\mu\text{l}$  d'une solution de RNase à 5 mg/ml. Après une incubation de 1 h à 37°C, une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique est réalisée et l'ADN du surnageant est

précipité par ajout de 0,1 volume d'Acetate de sodium 3 M et de 2,5 volume d'éthanol. Le culot obtenu après centrifugation de 5 minutes à 14 000 tours/min est lavé à l'éthanol 70%, séché, puis resuspendu dans au moins 0,5 ml de TE.

5

**EXEMPLE 1 :****Clonage de la région *hrpC2* de RPA-BIOTCAT826**

10 La région visée a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche RPA-BIOTCAT826 en utilisant les amores XcC2.3 (SEQ ID N°1) et XcC2.4 (SEQ ID N°2). L'ADN génomique de la souche RPA-BIOTCAT826 a été extrait et utilisé dans une réaction de PCR contenant 100 ng d'ADN génomique, 40 pmole de chaque amorce, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 30 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, puis 1 min à une température allant de 63°C à 48°C (par pas de 0,5°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 15 cycles comprenant une incubation de 1 min à 94°C, suivie de 1 min à 48°C et d'une minute à 72°C, et enfin 10 min à 72°C. Le produit d'amplification de taille voisine de 1,2 kb a été purifié par migration sur gel d'agarose puis à l'aide du kit Qiaex (Qiagen). Il a ensuite été cloné dans le vecteur pZERO-1 (Invitrogen BV) ouvert par EcoRV. Après transformation de la souche *E. coli* JM110, un clone hébergeant un plasmide ayant intégré le fragment de 1,2 kb a été retenu. Ce plasmide a été appelé pRPA-BCAT91 et l'insert qu'il contenait a été séquencé (Genome Express, Grenoble, France). La séquence obtenue (SEQ ID N°3) a été alignée avec la séquence du gène *hrpC2* de *X. campestris* *pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396). Une identité de 87% a été trouvée sur les 1188 bp représentant 61% du gène *hrpC2*. La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique montre un pourcentage d'identité de 92% par rapport à la portion équivalente de la séquence de la protéine *HrpC2* de *X. campestris* *pv vesicatoria*.

**EXEMPLE 2 :****Clonage de la région HrpA de RPA-BIOCAT826**

5

Cette région a été clonée en criblant une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 à l'aide d'une sonde nucléotidique correspondant à la région équivalente de la souche *X. campestris* *pv* *vesicatoria*. Cette région est disponible dans un plasmide dénommé pL3o qui 10 contient un insert de 6,6 kb EcoRV englobant les gènes *hrpB8* et *hrpA1* de *X. campestris* *pv* *vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

10

La sonde HRPA1 a été préparée par PCR en utilisant les amorce XcvA15 (SEQ ID N°4) et XcvA18 (SEQ ID N°5) à raison de 40 pmole 15 chacune, la matrice plasmidique pL3o (40 ng), 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a subi 30 cycles comprenant une séquence de 30 secondes à 94°C, 1 min à 55°C et 1,5 min à 72°C. Après une dernière incubation de 10 min à 72°C, le 20 produit d'amplification de 664 bp a été purifié sur gel d'agarose puis par le kit Quiaex (Quiagen).

20

25

30

Environ 10µg d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 ont été digérés par 100 unités d'EcoRI pendant 16h à 37°C. La technique classique de Southern Blot a ensuite été employée afin de déterminer la taille du fragment EcoRI hybridant avec la sonde HRPA1 décrite ci-dessus. Après migration sur gel d'agarose de la digestion EcoRI ci-dessus, transfert sur une membrane Hybond N+ (Amersham) par hybridation à 55°C pendant 19h dans une solution aqueuse d'hybridation (0,5 % SDS ; 6% SSC ; 0,25% de lait écrémé en poudre) avec la sonde HRPA1 marquée au phosphore 32 grâce au kit Ready-To-Go (Pharmacia Biotech) selon les indications du fabricant et lavage à 55°C par une solution de 0,2 SSC et 0,1% SDS, la membrane a été mise en autoradiographie pendant 19 h à -80°C. Le développement du film a révélé un signal d'hybridation de taille voisine de 7,3 kb.

Une banque partielle génomique de la souche RPA-BIOCAT826 a donc été réalisée en digérant 100 µg d'ADN génomique de cette souche par 1000 unités de l'enzyme EcoRI pendant 20 h à 37°C. Après migration sur gel d'agarose, la zone correspondante aux fragments de taille comprise entre 7 et 8 kb a été découpée et l'ADN extrait du gel par électroélution dans un boudin de dialyse (membranes Spectra/Por de Spectrum Medical Industries, Inc). Après précipitation à l'éthanol, l'ADN a été ligaturé dans un volume final de 10 µl au vecteur pBlueScript II SK (Stratagene) préalablement ouvert par l'enzyme EcoRI puis dephosphorylé avec la phosphatase alcaline de crevette (United States Biochemicals). Après incubation du mélange de ligation 14h à 16°C, un dixième du mélange a été utilisé pour transformer par électroporation des cellules d'*E. coli* DH5alpha. Environ 3000 transformants ont été analysés par hybridation de colonies transférées sur membrane de nylon en utilisant la sonde HRPA1. Douze colonies donnant un signal d'hybridation positif ont été purifiées sur milieu gélosé LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Les plasmides de douze colonies purifiées ont été extraits et des digestions EcoRI des ces plasmides ont été analysées par Southern blot avec la sonde HRPA1 pour confirmer la présence d'un fragment d'environ 7,3 kb hybrideant avec cette sonde. Après une analyse de restriction avec diverses enzymes, un fragment de 2,7 kb SacII et un fragment de 1,6 kb SacII ont été sous-clonés dans le vecteur pBlueScript II SK ouvert par SacII pour donner respectivement les vecteurs pRPA-BCAT135 et pRPA-BCAT134. Le séquençage partiel de ces deux vecteurs a été réalisé (Genome Express, Grenoble) et a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture de 1818 bp (SEQ ID N°6) dont la séquence peptidique déduite présente 85% d'identité avec la protéine HrpA1 de *X. campestris* pv *vesicatoria* (Fenselau et al., 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396).

**EXAMPLE 3 :**

Construction de souches dérivées de RPA-BIOCAT826  
contenant une délétion *ΔhrpA1-C2*

La délétion  $\Delta hrpA1-C2$  a été construite *in vitro* en clonant dans le plasmide pJQ200SK (Quandt et Hynes, 1993, Gene 127 : 15-21) un fragment de pRPA-BCAT134 et un fragment de pRPA-BCAT91 (cf figure 1). Le plasmide pRPA-BCAT91 a été ouvert par Ncol puis traité à la polymérase I (fragment de Klenow) pendant 15 min à 30°C en présence de 25 $\mu$ M de dNTP. Après extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique puis précipitation à l'éthanol, l'échantillon a été repris dans 40  $\mu$ l d'eau pour être traité par 20 unités de XbaI à 37°C puis et 20 unités d'Apol à 50°C. Le fragment d'environ 1,2 kb a alors été séparé sur gel et récupéré avec le kit Quiex II (Qiagen). Le fragment d'environ 1,3 kb RsaI-SacII de pBCAT134 a été purifié de façon identique. Ces deux fragments ont été ligaturés au vecteur pBlueScript II SK ouvert par les enzymes SacII et XbaI pour donner le plasmide pRPA-BCAT139. Un fragment SacI-XbaI d'environ 2,5 kb porteur de la délétion  $\Delta hrpA1-C2$  a alors pu être extrait de ce plasmide pour être cloné dans le plasmide pJQ200KS ouvert par les enzymes SacI et XbaI. Le plasmide résultant a été nommé pRPA-BCAT140. C'est un plasmide non réplicatif chez *X. campestris*, porteur du marqueur de résistance à la gentamycine permettant de sélectionner les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide par recombinaison homologue et porteur du marqueur de sélection positive sacB qui permet de sélectionner les clones ayant éliminé le marqueur de résistance à la gentamycine suite à un deuxième événement de recombinaison homologue.

Le plasmide pRPA-BCAT140 a été introduit dans la souche RPA-BIOCAT826 par conjugaison. Pour ce faire, ont été mélangés sur milieu gélosé MSX 40  $\mu$ l d'une culture en phase exponentielle de la souche DH5alpha hébergeant pRPA-BCAT140, 40  $\mu$ l d'une culture en phase exponentielle de la souche HB101 hébergeant le plasmide pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 7347-7351) et 40  $\mu$ l d'une culture de la souche RPA-BIOCAT826 en phase exponentielle dans un milieu MSX. Après incubation pendant 24h à 30°C, les clones de *X. campestris* ayant intégré le plasmide pRPA-BCAT140 ont été purifiés deux fois de suite sur un milieu gélosé MSX contenant 15  $\mu$ g/ml de gentamycine. Huit clones ont ensuite été étalés sur une surface d'environ 1 cm<sup>2</sup> sur un milieu gélosé MSX.

contenant 5% de sucre. Après une incubation de 72h à 30°C, des colonies ont été isolées par deux purifications successives sur milieu gélosé MSX. Environ 300 colonies ont ensuite été repiquées sur milieu gélosé MSX contenant 15 µg/ml de gentamycine afin d'identifier les clones sensibles à la gentamycine (de 90 à 100 % des clones en fonction des essais). Une quarantaine de ces clones ont ensuite été analysés par Southern Blot en utilisant une digestion EcoRI-BamHI de leur ADN génomique et la sonde HRPA1. Environ 25 % des clones présentaient un signal différent de celui de la souche sauvage RPA-BIOCATE826 et cohérent avec l'intégration de la délétion *ΔhrpA1-C2*. Cinq clones ont été retenus pour la suite des expériences : souches RPA-BIOCATE 1016, 1017, 1019, 1021, 1022.

#### EXEMPLE 4 :

#### Caractérisation par Southern Blot des souches dérivées de RPA-BIOCATE826 contenant une délétion *ΔhrpA1-C2*

Les souches RPA-BIOCATE 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 ont été caractérisées en analysant les profils d'hybridation de digestions d'ADN génomique EcoRI, BamHI et EcoRI-BamHI avec les sondes HRP3'A1, HRPB5 et HRPC2.

La sonde HRP3'A1 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,6 kb SacII du plasmide pRPA-BCAT134 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPC2 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,2 kb EcoRI-XbaI du plasmide pRPA-BCAT91 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex.

La sonde HRPB5 a été obtenue en purifiant le fragment de 1,5 kb BamHI du plasmide pRPA-BCAT129 par migration sur gel et utilisation du kit Quiaex. Le séquençage de cet insert a révélé notamment une phase ouverte de lecture (SEQ ID n°7) dont la séquence peptidique déduite présente 77% d'identité avec la protéine HrpB5 de *X. campestris* *pv vesicatoria* (Fenselau et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). Le plasmide pRPA-

BCAT129 a été obtenu en clonant les fragments BamHI d'ADN génomique de la souche RPA-BIOCAT826 de taille comprise entre 1,3 et 1,9 kb dans le vecteur pBlueScriptII SK et en criblant les colonies avec une sonde HRPB de manière analogue à celle décrite dans l'exemple 2. La sonde HRPB a été obtenue par PCR en utilisant les amorces RST2 et RST3 (Leite et al., 1994, Appl. Environ. Microbiol. 60 : 1068-1077) et la matrice plasmidique pB10g (U. Bonas, communication personnelle). Le plasmide pB10g correspond au plasmide pBluescriptKS dans lequel est cloné le fragment de 7,3 kb BamHI contenant la région *hrpB* et le gène *hrpA1* de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Fenselau et al., 1995, Mol. Plant-Microbe Interactions, 8 : 845-854). La réaction de PCR a été réalisée avec 40 pmole de chaque amorce, 50 ng de pB10g, 0,2 mM dNTP, 1,25 U de polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) dans un volume final de 50 µl du tampon de cette enzyme. Après une incubation de 5 min à 95°C, le mélange a d'abord subi 24 cycles comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, puis 40 secondes à une température allant de 70°C à 63°C (par pas de 0,3°C par cycle) et 1 min à 72°C, puis 6 cycles comprenant une incubation de 30 secondes à 95°C, suivie de 40 secondes à 63°C et d'une minute à 72°C, et enfin 5 min à 72°C. Le fragment d'environ 840 bp a ensuite été purifié sur gel d'agarose et à l'aide du kit Quiaex (Quiagen).

L'analyse en Southern Blot a été réalisée en marquant les sondes à l'aide du kit « Megaprime DNA labelling system » (Amersham) selon les instructions fournies. Après migration sur gel d'agarose, les digestions d'ADN génomiques ont été transférées sur membranes Hybond N+ (Amersham) selon les indications fournies, puis incubées dans la solution d'hybridation composée d'un tampon phosphate 0,5M et de SDS 7% (115 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, 84,6 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> M, 200 ml H<sub>2</sub>O, 28 g SDS). Les sondes marquées sont incubées 5 min à 100 °C, puis 5 min à température ambiante avant d'être diluées dans 12 ml de solution d'hybridation et incubées 5 min à 100°C. Ce mélange est alors mis au contact des membranes pendant 6 à 20 h à 65°C. Celles-ci sont ensuite lavées 10 à 15 minutes dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 1% de SDS (42,3 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, 57,7 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M, 900 ml H<sub>2</sub>O, 10 g SDS) puis mis en exposition.

Les résultats obtenus avec la sonde HRPB5 (figure 2) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 4,8 kb avec la digestion EcoRI et un signal à 1,6 kb avec la digestion BamHI et la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Aucune des souches RPA-BIOCAT étudiées ne montre de signal d'hybridation avec HRPB5, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion  $\Delta hrpA1-C2$  dans le génome de ces souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022 (La figure 2 ne montre que le résultat d'hybridation obtenu avec les souches RPA-BIOCAT).

Les résultats obtenus avec la sonde HRPC2 (figure 3) montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à environ 5,5 kb avec les digestions EcoRI et un signal à environ 2,6 kb avec la digestion EcoRI-BamHI. Ces résultats sont en accord avec la cartographie de Arlat *et al.* (Molecular Plant-Microbe Interactions, 1991, 4 : 593-601), l'organisation des gènes *hrp* chez *X. campestris* *pv* *vesicatoria* (Fenselau *et al.*, 1992, Molecular Plant-Microbe Interactions, 5 : 390-396) et la localisation du gène *hrpB5* décrit ci-dessus. Les résultats obtenus avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 montrent un signal entre 7 et 8 kb avec les digestions BamHI et un signal à 4,4 kb avec les digestions EcoRI-BamHI. Compte tenu de la cartographie présentée dans la figure 1, ces résultats sont cohérents avec l'intégration de la délétion  $\Delta hrpA1-C2$  dans le génome des souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021 et 1022.

Enfin, les résultats obtenus avec la sonde HRP3'A1 montrent, pour la souche RPA-BIOCAT826, un signal d'hybridation à 7,3 kb environ pour la digestion EcoRI-BamHI. Avec les souches RPA-BIOCAT 1016, 1017, 1019, 1021, ce signal d'hybridation est à 4,4 kb, ce qui est cohérent avec l'intégration de la délétion  $\Delta hrpA1-C2$  dans le génome des ces souches.

**EXEMPLE 5 :****Virulence des souches dérivées de RPA-BIOCAT826  
contenant une délétion HrpA1-C2**

5

Les tests de virulence ont été effectués sur des plants de choux (*Brassica oleracea* var. *captiva* cultivar *Siria*) dont les semences ont été obtenues auprès de Clause Semences (av. Lucien Clause, 91221 Brétigny-sur-Orge, France). Les plantes ont été cultivées en cellule climatique selon les paramètres suivants : 14 heures à 25°C, 55% d'humidité, intensité lumineuse saturante (4000 W/m) ; 10 heures à 25°C, 60% d'humidité. Elles ont été infectées au stade 2 feuilles soit environ 13 jours après semis. Pour chaque souche testée, 8 plants ont été utilisés en perçant la première feuille dans la nervure centrale de la partie terminale à l'aide d'un cure-dent infecté. La contamination du cure-dent a été réalisée en immergeant sa pointe dans une culture de la souche étudiée de 2 jours en milieu MSX (environ 10<sup>8</sup> bactéries/ml). Les contrôles négatifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* *pv vesicatoria* (souche B229RI = RPA-BIOCAT381 et souche B230RII = RPA-BIOCAT382), phytopathogènes de référence sur piments isolées chez Clause Semences. Les contrôles positifs étaient constitués par un mélange de souches de *X. campestris* *pv campestris* (souche 2963 = RPA-BIOCAT379 et souche 63C2AM = RPA-BIOCAT380), phytopathogènes de référence sur choux isolées chez Clause Semences. Les symptômes (lésions jaunes en forme de V) ont été lus et mesurés 12 et 14 jours après infection. Pour chaque plante, une note a été donnée selon la correspondance suivante : 0, aucun symptôme ; 1, dépigmentation localisée à proximité du point d'infection ; 2, nécrose inférieure à 0,5 cm<sup>2</sup> ; 3, nécrose de 0,5 à 1,5 cm<sup>2</sup> ; 4, nécrose supérieure à 1,5 cm<sup>2</sup> ; 5, nécrose généralisée de la feuille. La somme des notes des 8 plantes infectées avec la même souche est la note de pathogénicité de cette souche (Tableau 1).

**Tabl au 1 : Phytopatogénicité d s souches de *Xanthomonas***

SOUCHE	J + 12	J + 14
BIOCATE 381/382	0	0
BIOCATE 379/380	32	39
BIOCATE 826	28	34
BIOCATE 1016	4	4
BIOCATE 1017	5	5
BIOCATE 1019	2	3
BIOCATE 1021	1	1
BIOCATE 1022	4	5

5

Alors que la souche RPA-BIOCATE 826 provoque le flétrissement progressif de la feuille, les souches construites provoquent au maximum un flétrissement nécrotique localisé, ce qui traduit une absence de pathogénicité.

10

**EXEMPLE 6 :**

**Production de xanthane par les souches dérivées de RPA-BIOCATE 826 contenant une délétion HrpA1-C2**

5

La productivité de xanthane des souches a été évaluée en mesurant la matière sèche précipitable à l'isopropanol contenu dans 40 ml de culture. Après 24 heures de préculture en MSX, 100 ml de milieu MSX en fioles erlenmeyers de 500 ml ont été inoculés avec approximativement le même nombre de bactéries (0,4 ml de préculture de OD660 = 0,25). Après 6 jours d'incubation à 30°C sous agitation (200 tours/min), 40 grammes de cultures ont été prélevés et mélangés à 150 ml d'isopropanol. Après filtration, les fibres récupérées ont été lavées deux fois par 70 ml d'isopropanol avant d'être séchées puis pesées en sortie d'étuve. L'opération réalisée sur trois cultures indépendantes de la souche RPA-BIOCATE 826 a montré une variabilité de la productivité de l'ordre de 10 %. Les résultats obtenus avec la souche

20

25

RPA-BIOCAT826 et ses dérivées  $\Delta hrpA1-C2$  sont regroupés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Productivité de xanthane de RPA-BIOCAT826 et de ses dérivés  $\Delta hrpA1-C2$ .

SOUCHE	POIDS SEC Xt (g)	PRODUCTIVITE (g/g)
BIOCAT826	0,323	$8,1 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1016	0,362	$9,0 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1017	0,366	$9,1 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1019	0,371	$9,3 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1021	0,334	$8,4 \times 10^{-3}$
BIOCAT 1022	0,329	$8,2 \times 10^{-3}$

Les productivités sont exprimées en grammes de matière sèche extractible à l'isopropanol par grammes de culture.

REVENDICATIONS

1. Souche bactérienne ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

2. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation d'au moins un gène, avantageusement au moins deux gènes, de préférence au moins trois gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

3. Souche bactérienne selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a été rendue stablement non phytopathogène par inactivation de 5 à 9 gènes du groupe de gènes *hrp* ou *hrc*.

4. Souche bactérienne selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une souche *Xanthomonas* ayant perdu le caractère phytopathogène par inactivation d'au moins un gène de virulence et ayant conservé la capacité de production d'exopolysaccharide.

5. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est de l'espèce *Xanthomonas campestris*.

6. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 5, caractérisée en ce qu'il s'agit de *Xanthomonas campestris* *pv campestris*.

7. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'inactivation du ou desdit(s) gène(s) est obtenue par délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

8. Souche *Xanthomonas* selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au plus 40 kb.

5

9. Souche *Xanthomonas* selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1* à *hrpC2*.

10. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle comprend une délétion d'une région d'ADN d'au moins 1 kb, de préférence au moins 3 kb, avantageusement au moins 5 kb dans le groupe de gènes *hrp* ou *hrc*, et en ce qu'elle conserve la capacité de produire de l'exopolysaccharide.

15 11. Souche *Xanthomonas* essentiellement non phytopathogène, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par délétion de tout ou partie des gènes *hrp A1-C2*.

20 12. Souches *Xanthomonas campestris* essentiellement non phytopathogènes choisies parmi les souches BIOCATE 1016, BIOCATE 1017, BIOCATE 1019, BIOCATE 1021 et BIOCATE 1022, déposées à la CBS respectivement sous les numéros CBS 101940, CBS 101941, CBS 101942, CBS 101943 et CBS 101944.

25 13. Souche *Xanthomonas* selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisée en ce que l'exopolysaccharide est une gomme xanthane.

30 14. Plasmide pRPA-BCAT 140 utilisé pour la fabrication de la souche selon les revendications 9 à 13.

15. Procédé de préparation d'une souche selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce qu'elle est obtenue par

21

recombinaison homologue avec un plasmide comprenant une délétion de tout ou partie des gènes *hrp* ou *hrc*.

5           16. Procédé de préparation d'exopolysaccharide bactérien, notamment de gomme xanthane, caractérisé en ce que l'on cultive une souche bactérienne, le cas échéant, du genre *Xanthomonas*, de préférence l'espèce *Xanthomonas campestris* selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, dans des conditions permettant la production d'exopolysaccharide dans le milieu de fermentation.

10

17. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3.

15           18. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n° 6.

19. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID n°7.

1/2

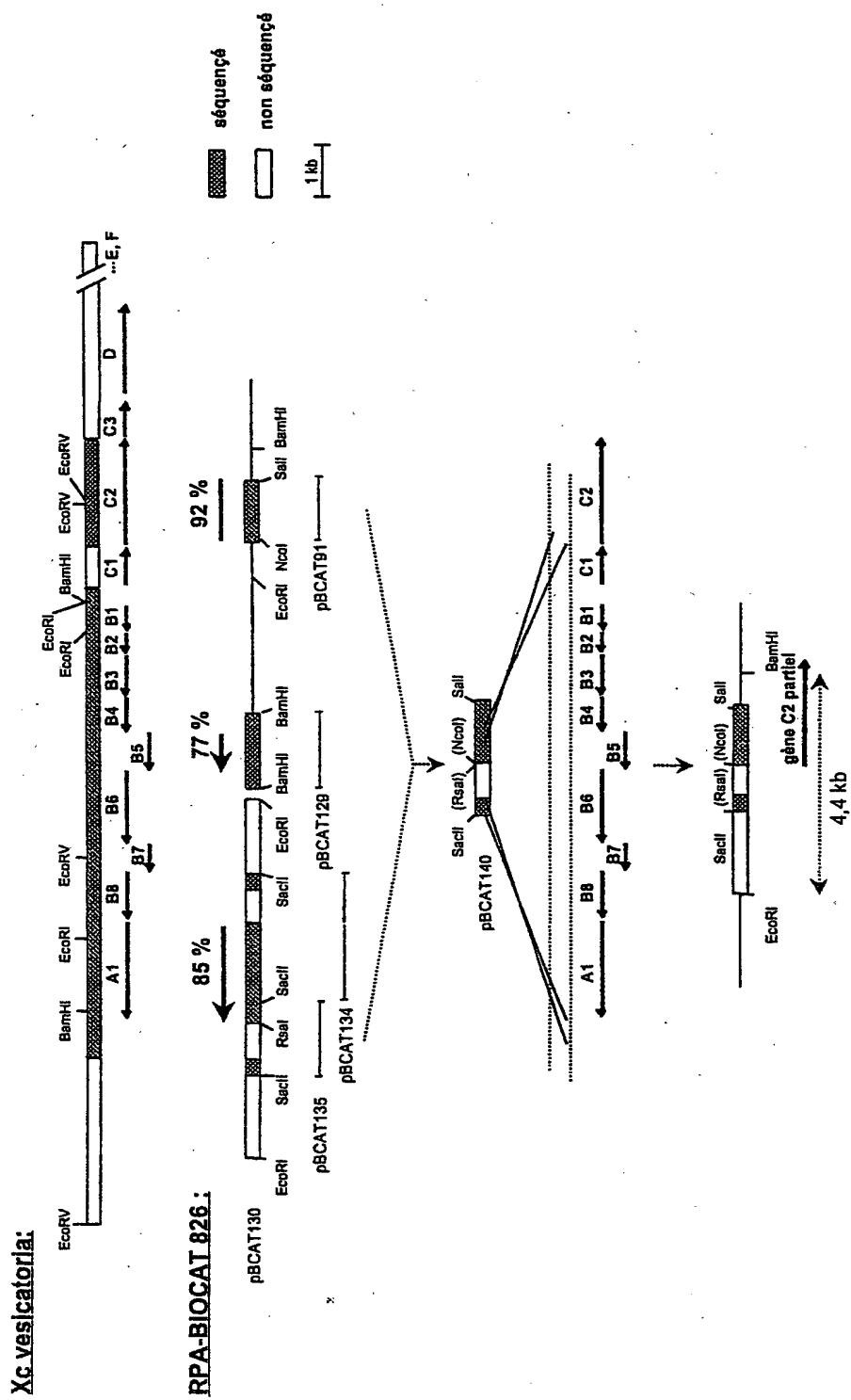


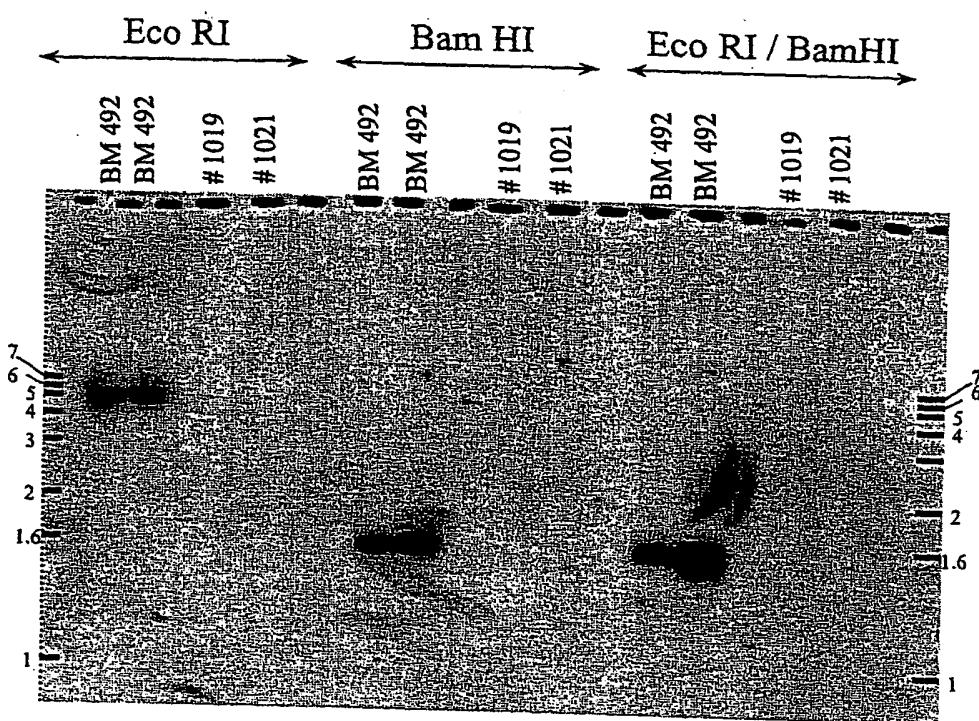
FIG. 1

10/018786

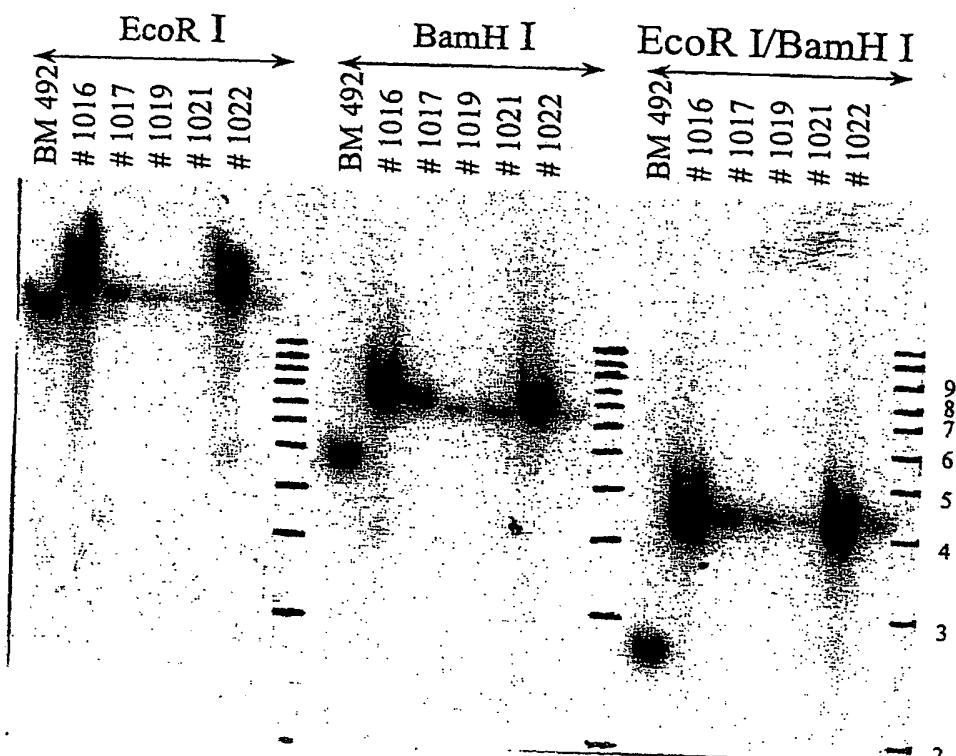
WO 00/78967

PCT/FR00/01725

2/2



**FIG.2**



**FIG.3**

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; RHODIA CHIMIE

&lt;120&gt; Nouvelles souches bactériennes, notamment de Xanthomonas, en particulier Xanthomonas campestris

&lt;130&gt; BFF 99/0315

&lt;140&gt; FR 9907963

&lt;141&gt; 1999-06-22

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 1

aaattcgtca agggtgatgc

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

&lt;400&gt; 2

gttccacactg gtcgacaaggc

20

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1189

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Xanthomonas campestris

&lt;400&gt; 3

 aaattcgtca agggtgatgc gatcgccggc ctgggtatca ccatggtcaa catcttggcc 60  
 ggcacatcggtt taggcgtgac ctaccacggc atgagcgcgg gcgaggccgc caaccgcttt 120  
 gcgatccgtt cggtagggca tgcgatggtg tcgcagatcg cctcgctgt gatctcggtt 180  
 gggccggcg tcatgatcac ccgcgtcgcc aacgagaatg aaaccaagat cagctcgctc 240  
 gggctcgaca tcggccgcca gtcaccaggc aacgcacgtg cttgtatggc agcgagtgtg 300  
 ctgtcggtt gcttgcgtt cgtgccgggaa ttccggcgc tgctgttccct gctgctggca 360  
 gccccggctcg gtgccggggg ctatacgatc tggcgcaagc aacgcgacac cagcgggagc 420  
 gatcggcccg cactgcccata aaccagccgc aaagggtgcca aaggcgatgc gcccacatc 480  
 cgcaagagcg ccccggtt cgcctcgccc ttgtcgatgc ggcttcgccc gcaactggct 540  
 gcacggctcg acccgccgct gctggatcag gcgatcgaaa gcgagcggag gcaattggtc 600  
 gagctgttgg gattgcgtt cccggggatc gcgatatggc agagcgaatc cctgcaggc 660  
 ctgcgttgcgtt aagtgttgcgtt ccacgtatgc cccggaaaccc gcagcgcgtt gagcgatacg 720  
 gcggacatgc agaaaagcgct ggcccaacaa gccatcgcac cggtgcgtc acgcgcgtatc 780

ctgttcgtcg gcatccagga gacgcagtgg atgctggAAC aggtgggcgc ggactatccc 840  
 gggctggttg cagaggtcaa caaggccatg ccagcccaac gcatcgccga tgtgttgcgg 900  
 cgaactgctgg aagaacgcac cccgggtgcgc aacatcaaga gcatcctggA gagecctgggt 960  
 gtgtggggac cgaaggaaaa ggatctgtg atgctgaccg agtatgtgcg ctgcgatctc 1020  
 ggcgcgtatc ttgcgcacac cgcgaccgca ggcacccggac agctgcctgc ggtgatgctc 1080  
 gaccacgccc tggAACAGTT gatccggcag tcgattcgcg ccacacccggc cggcaatttc 1140  
 ctggcgctgc caccggagca ggccaatcag cttgtcgacc aggtggAAA 1189

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 4  
 gatccaacacg ctggacaacc

20

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 5  
 aacggaaatct tcgacaggcc

20

<210> 6  
 <211> 1818  
 <212> ADN  
 <213> Xanthomonas campestris

<400> 6  
 atggcatacg cctgtcctcc agttcaccgc catcgacgcg cgccgttggc cgctgcctt 60  
 ttgcttggct tgctgcccgt gctgcccgg catgccaacg ccgcgtcggt gccgtggcac 120  
 tcgcgcagct tcaaatacgt tgccgaccgc aaggatctca aggaggtgct ggcgcacctg 180  
 tccgcccggcc aatccatcac cacctggatt tcacccggagg tgaccggcac gctcagtggc 240  
 aaattcgaag ccactccgca gaagtttctc gacgatctat cgggcacgtt cggttttgtc 300  
 tggtattacg atggctcggt gtcagaatac tggggcgcga acgagaccaa gaatgcgacc 360  
 ttgagtttgg ggcgtgcattc gacgagtgcg ctgcgcgatc cgcttgcgcg catgcggctg 420  
 gacgatccgc gctttccggc cgcgtatgac gagacagcgc acctggcggt ggtgtcgggc 480  
 ccgcccgggtt atgtggatac cgtcgcggcg atgcgcac aggtcgagca ggtcgccgccc 540  
 caacgcgacg ccaccgaagt gcaggtgttt cagctgcatt atgcgcagcc ggccgaccc 600  
 accacccgcgatc tgggtgtca agacatccag gtgcggggca tggccagcct gttgcgcac 660  
 atatacggcg tgcgtggcgc gcccactgcg ggcgtgcggc ggccaggcgc gaatttcggg 720  
 cgtgtgcacac cgatcgccgg tggctcgatcc aataccatcg gcaacagcgg tcagcgcac 780  
 agtggcgca ggcgcattct cggtttgcgt ggcgtcggt tcggcgctgg gtcgcccgtcc 840  
 gagcgggtgc cggtcagtcc ggcgttgcgcg ggcagtggca atagcgcacaa tgcgcccggcc 900  
 agcgtgtggc cggagatgag ccaggccaga cgcgtgcgc cgctggcggt ggacgcccggc 960  
 agcggcggtg agctggatc cgcgcgcgc gtcgtcgatc ggcgcctatc gcacgttgcg caccacccggc 1020  
 attctcatcc ggcaccggccc cggcggatc ggcgcctatc gcacgttgcg ccagcagctc 1080  
 gacaaccgtc ccaagctgtc gcaagatcgat ggcaccatca tcgagatccg cgacggcgcc 1140  
 ctgcaggatc tggcggttca cttgtcgacc aggtggatgt gtcgtcgatc 1200

gacggggcgtg gtggccagct tggctacgat ggcagcttga gcgggtgcagc agccgcccgt 1260  
gcagccgcgc cggtggcggt gacgttgcacc gctgtctgg gcgatgcagg gcgttacctg 1320  
atgacgcgcg tctcggcgct cgagcagacc aacaaggcca agatcgctc caccccgccag 1380  
gtggcgacgc tggacaacgt ggaagcggtg atggaccaca agcaacaggc attcggtcg 1440  
gtcagcggtt atgcattccgc cgacctctac aacctgtccg cgggtgtatc gctacgcgt 1500  
ttgccaagtg tggtgccggg gtcgccaaat ggtcagatgc gcctggatgt gctatcgaa 1560  
gacgggcagt tggcgccaa taccgtcgat ggcattcccg tcatacacctc cagcgagatc 1620  
accacgcagg ccttcgtcaa cgagggccag agcctgtga tcgcccgtta tgctccgac 1680  
accgatcaga cagatctgaa caacgtcccc gggtgtcca ggattccatt ggtcggcaac 1740  
ctgttcaagc atcgccagca gagcgggtcg cggttgcagc ggttgttccct gctgaccgg 1800  
catatcgctc cgccctga 1818

<210> 7  
<211> 702  
<212> ADN  
<213> *Xanthomonas campestris*

<400> 7  
atgcgtcttt ggctgaggtc cacaccgaa gcggtcggcc ttgactgcga ggtcatccca 60  
cgcgaggcat tggcctgtgt gctgaaactg gacgcagcgg gtgcacagggt gcacgcgcgt 120  
tgegcgcagg cgctggcgga cgcccagacg cgtgcgcagg cgctgctcga cgctgccaa 180  
cggcaggccg aggccatccct tcaggatgcc cacgacacagg ccgagcgcag tgcacgcctg 240  
ggctatgcgg cggggctgcg ccgtcagctc gacgcgtgga acgagcgcgg cgtgcggcat 300  
gccttcgcgg cccaggacgc cgacacggcgc gcccgcgagc gcctggccga gatcgtcg 360  
cacgcctgcg agcagggttct gcacgggcac gatccctgcgg cgctgtacgc ggcgcgcgc 420  
caggegctgg acggcgcctt ggacgaggcg aacgccttcg aggtgagcgt gcatecccgat 480  
gcgcgtggacg atgcacggcg cgcctcgat gcggccgcag cggccggcgg atggagcgt 540  
ccgggtggaaac tggcggtga tacgactctg gccttgggtg cctgcgtgtg cgaatggat 600  
accggcgtgt tggagaccga tctgcgtgat cagctgcgcga gtctccggcg cgtcattcgc 660  
cgcgtgttgg ccacgcccga ggcggcgccg gatgcttgc 702

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No  
PCT/00/01725

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 // (C12N1/21, C12R1:64)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCELLULAR COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193	1-8, 15
Y	abstract ----	9-12 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 October 2000

Date of mailing of the international search report

23/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lejeune, R

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/00/01725

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"            MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601,            XP000908703            ISSN: 0894-0282            cited in the application            abstract            page 598, right-hand column, paragraph 5            page 599, right-hand column, last            paragraph</p> <p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"            MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285,            XP000901966            ISSN: 0894-0282            cited in the application            abstract</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	1-8, 15
		1, 2, 4-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 00/01725

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Category	Relevant to claim No.
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, October 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cited in the application</p>	17-19
Y	<p>the whole document</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online!'</p> <p>AC M99176, 10 September 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds"</p> <p>XP002137003</p> <p>87.2% identity (1188 base pairs) with SEQ ID NO 3</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online!'</p> <p>AC U33548, 10 November 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris <i>hrpB</i> pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds."</p> <p>XP002137004</p> <p>78.8% identity (1043 base pairs) with SEQ ID NO 6</p> <p>80.2% identity (702 base pairs) with SEQ ID NO 7</p> <p>-----</p>	9-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar Internationale No

PCT/00/01725

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/31 C12P19/06 C07K14/21 C12N1/21 //C12N1/21,  
C12R1:64)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BIOSIS, EMBL, STRAND, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAMOUN S ET AL: "A PLANT-INDUCIBLE GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS ENCODES AN EXOCYTIC COMPONENT REQUIRED FOR GROWTH IN THE HOST AND HYPERSENSITIVITY ON NONHOSTS" JOURNAL OF BACTERIOLOGY 1990, vol. 172, no. 9, 1990, pages 5165-5172, XP000906789 ISSN: 0021-9193  abrégé	1-8, 15
Y	----- -/-	9-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constitutifs la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Lejeune, R

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/00/01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ARLAT M ET AL: "XANTHOMONAS-CAMPESTRIS CONTAINS A CLUSTER OF HRP GENES RELATED TO THE LARGER HRP CLUSTER OF PSEUDOMONAS-SOLANACEARUM"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1991, vol. 4, no. 6, 1991, pages 593-601,</p> <p>XP000908703</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p> <p>abrégé</p> <p>page 598, colonne de droite, alinéa 5</p> <p>page 599, colonne de droite, dernier alinéa</p> <p>---</p>	1-8, 15
X	<p>OSBOURN A E ET AL: "IDENTIFICATION AND DNA SEQUENCE OF A PATHOGENICITY GENE OF XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PATHOVAR CAMPESTRIS"</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS 1990, vol. 3, no. 5, 1990, pages 280-285,</p> <p>XP000901966</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p> <p>abrégé</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1, 2, 4-6

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/00/01725

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENSELAU S ET AL: "Determinants of pathogenicity in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatori</i> related to proteins involved in secretion in bacterial pathogens of animals."</p> <p>MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS., vol. 5, no. 5, octobre 1992 (1992-10), pages 390-396, XP000908705</p> <p>APS PRESS, ST. PAUL, MN, US</p> <p>ISSN: 0894-0282</p> <p>cité dans la demande</p>	17-19
Y	<p>le document en entier</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC M99176, 10 septembre 1993 (1993-09-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris HrpC2 gene, complete cds" XP002137003</p> <p>* 87.2% d'identité (1188 paires de bases) avec SEQ ID NO 3 *</p> <p>-&amp; DATABASE EMBL 'en ligne!</p> <p>AC U33548, 10 novembre 1995 (1995-11-10)</p> <p>FENSELAU ET AL: "Xanthomonas campestris <i>hrpB</i> pathogenicity locus proteins HrpB1, HrpB2, HrpB3, HrpB4, HrpB5, HrpB6, HrpB7, HrpB8, HrpA1, and ORF62 genes, complete cds." XP002137004</p> <p>* 78.8% d'identité (1043 paires de bases) avec SEQ ID NO 6 *</p> <p>* 80.2% d'identité (702 paires de bases) avec SEQ ID NO 7 *</p>	9-12